

Pembentukan 8-OHdG dari Zat Toksik Pemicu Radikal Bebas

Intan Cahaya Dani¹, Budiawan¹

¹Program Studi Kimia, Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Indonesia, Depok 16424, Indonesia

Email : dr.budiawan@gmail.com

Abstrak

Untuk melihat profil pembentukan DNA Adduct (8-OHdG) sebagai indikator kerusakan DNA, dilakukan studi *in vitro* pembentukan DNA Adduct (8-OHdG) dengan *calf thymus* DNA dan beberapa senyawa yang memiliki toksisitas tinggi sebagai pemicu radikal bebas dan dapat menyebabkan kerusakan DNA secara oksidatif yang memicu peristiwa karsinogenesis, seperti PAH (Benzo[a]piren), TiO₂ dan CuCl₂. Pada percobaan ini, *calf thymus* DNA diinkubasi dengan senyawa Benzo[a]piren dan CuCl₂ di bawah kondisi variasi pH serta suhu. Dilakukan pula inkubasi *calf thymus* DNA dan TiO₂ dengan bantuan radiasi sinar UV (254 nm) yang dapat menginduksi terbentuknya spesies oksigen reaktif (ROS) sehingga menyebabkan kerusakan oksidatif DNA. Dari hasil penelitian ini, ketiga senyawa tersebut memiliki potensi dalam pembentukan DNA Adduct (8-OHdG). Rasio kemurnian *calf thymus* DNA pada $\lambda_{260}/\lambda_{280}$ yang digunakan dalam penelitian ini adalah ~1.9. Terjadi pergeseran puncak panjang gelombang maksimum dari hasil inkubasi *calf thymus* DNA dan senyawa B[a]P serta CuCl₂ yang menandakan bahwa terjadi perubahan struktur DNA. Konsentrasi 8-OHdG tertinggi dihasilkan pada inkubasi *calf thymus* DNA dengan senyawa B[a]P dan CuCl₂ pada pH 8.5 dan suhu 60°C, yaitu 120.856 µg/L. Inkubasi *calf thymus* DNA dengan TiO₂ dan sinar UV (254 nm) pada pH 8.5 dapat menghasilkan 8-OHdG sebesar 57.025 µg/L.

Abstract

This study was conducted to observe the profile of DNA Adduct (8-OHdG) formation as DNA damage indicators, by using calf thymus DNA incubated with toxic and carcinogenic compounds. The compounds which could trigger free radicals in this research were PAH (Benzo[a]Pyrene), TiO₂, and CuCl₂. Calf thymus DNA was incubated with Benzo[a]Pyrene and CuCl₂ compounds under pH and temperature variations. The incubation of calf thymus DNA with TiO₂-UV radiation (254 nm) was used to induce the formation of reactive oxygen species (ROS) in the process of oxidative DNA damage. From this research, all of compounds have potency to trigger the formation of DNA Adduct (8-OHdG). The ratio of absorbance to assess the purity of DNA at 260 nm and 280 nm ($\lambda_{260}/\lambda_{280}$) was measured at ~1.9. The shifted peaks at λ_{max} were indicating changes on structures of DNA as a result of calf thymus DNA incubation with B[a]P and CuCl₂. The highest level of 8-OHdG results in calf thymus DNA incubation with B[a]P and CuCl₂ under pH 8.5 and incubation temperature at 60°C, was about 120.856 µg/L. Calf thymus DNA incubation with TiO₂-UV radiation (254 nm) under pH 8.5 resulting 8-OHdG level at 57.025 µg/L.

Keywords: 8-OHdG, biomarkers, DNA Adduct

PENDAHULUAN

Pola hidup yang tidak sehat serta kondisi lingkungan dengan potensi udara tercemar dapat memberikan kontribusi terhadap peningkatan risiko kanker. Potensi risiko kanker terus meningkat karena banyaknya sumber paparan senyawa kimia yang bersifat karsinogenik. Senyawa kimia yang bersifat karsinogen, merupakan senyawa yang jika terpapar pada manusia dapat menyumbangkan radikal bebas dalam tubuh dan jika berinteraksi dengan biomolekul seperti DNA dapat memicu terbentuknya sel kanker. Sel kanker mengalami pertumbuhan abnormal dan berbeda dari sel normalnya karena perubahan ekspresi gen (mutagenesis) yang mengacu pada ketidakseimbangan proliferasi sel dan kematian sel. Sel kanker dapat menyerang jaringan lain melalui pembuluh darah dan pembuluh limfa. Saat ini kanker merupakan penyakit mematikan nomor dua di dunia, setelah penyakit jantung (Askoxylakis, 2010).

Pada awalnya Hiroshi Kasai (1986), melakukan penelitian mengenai pemanasan glukosa yang memberikan efek mutagenik bagi *Salmonella typhimurium*. Selanjutnya dilaporkan bahwa beberapa mutagen dapat dideteksi dengan cara menganalisis *adduct* yang dihasilkan menggunakan turunan guanosa. Ketika glukosa yang dipanaskan direaksikan dengan turunan guanosa, *adduct* yang dihasilkan diisolasi dengan menggunakan HPLC. Struktur *adduct* yang ditemukan berupa hasil hidroksilasi pada posisi C-8 guanin. Hal ini menjadi awal dari penelitian mengenai bagaimana terjadinya

hidroksilasi dan kaitannya dengan mutagenesis. Penelitian Kasai selanjutnya dilakukan dengan mendeteksi dan mengidentifikasi *adduct* dari mutagen hasil pemanasan glukosa dengan senyawa turunan guanosa. Hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa tersebut dapat memproduksi oksigen radikal dan diketahui bersifat mutagenik/karsinogenik serta secara efektif dapat mengalami hidroksilasi pada basa guanin di DNA (Kasai, 1986).

Penelitian menggunakan senyawa Benzo[a] Piren untuk mendeteksi peran spesi oksigen reaktif dari hasil *adduct* dilakukan oleh Bryla dan Weyand secara *in vitro*. Selanjutnya dikembangkan penelitian berdasarkan pengaruh sistem redoks dalam tubuh dengan menggunakan Cu (Li. Y, 1993) dan Fe (E.S. Henie, 1996) sebagai katalis reaksi pembentukan spesies oksigen reaktif yang dapat menyebabkan terjadinya kerusakan oksidatif khususnya pada DNA (Valavanidis *et al.*, 2009)

Senyawa karsinogenik dapat berkontribusi terhadap pembentukan spesies oksigen reaktif (*Reactive Oxygen Species*, ROS) di dalam tubuh. Spesies oksigen reaktif ini dapat berinteraksi dengan biomolekul seperti DNA yang menyebabkan terjadinya kerusakan DNA yang jika tidak diperbaiki, dapat memicu terjadinya karsinogenesis. Mekanisme perbaikan DNA yang rusak melalui mekanisme *Base Excision Repair* (BER) dapat mengekskresikan DNA

rusak yang terpotong. DNA yang rusak dan terpotong melalui BER ini dapat ditemukan dalam bentuk 8-hidroksi-2'-deoksiguanosin (8-OHdG). Oleh karena itu 8-OHdG dapat digunakan sebagai biomarker risiko kanker terkait adanya paparan senyawa karsinogenik. (Valavanidis *et al.*, 2009).

Senyawa karsinogenik seperti Benzo[a] Piren dan senyawa yang dapat menghasilkan radikal bebas seperti CuCl_2 diinkubasi dengan *calf thymus* DNA dibawah kondisi pH serta suhu inkubasi yang divariasikan. Selain itu, dilakukan pula inkubasi dengan senyawa TiO_2 dengan bantuan sinar UV pada variasi pH untuk melihat profil pembentukan 8-OHdG. Melalui identifikasi secara *in vitro* menggunakan *calf thymus* DNA, penelitian ini dilakukan untuk membuktikan bahwa adanya paparan senyawa pemicu radikal bebas pada individu dapat meningkatkan kerusakan DNA secara oksidatif yang memicu peristiwa karsinogenesis (Valavanidis *et al.*, 2009). Dengan terdeteksinya 8-OHdG dengan metode yang digunakan pada penelitian ini, maka diharapkan penelitian ini dapat memberikan informasi cara mendeteksi dini risiko kanker sebagai upaya mengurangi atau mencegah terjadinya peristiwa kanker (karsinogenesis).

METODE

Riset dilakukan dengan pendekatan ilmiah, dan metode deskriptif berupa studi korelasi untuk menganalisis fenomena keterkaitan peningkatan risiko kanker dengan adanya

biomarker kerusakan DNA secara *in vitro* menggunakan DNA yang dipaparkan xenobiotika. Interaksi *calf thymus* DNA dengan senyawa B[a]P dan CuCl_2 dilakukan dengan melihat pergeseran panjang gelombang maksimum DNA menggunakan spektroskopi UV-Vis. Pembentukan 8-OHdG secara *in vitro* ini dilakukan dengan menginkubasi *calf thymus* DNA dengan senyawa B[a]P dan CuCl_2 pada variasi pH 7.4 dan 8.5 seta suhu inkubasi 37°C dan 60°C. Analisis 8-OHdG dilakukan dengan menggunakan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC).

Analisis kemurnian DNA

DNA (100 $\mu\text{g/mL}$) dibandingkan nilai absorbansinya pada panjang gelombang maksimal λ_{260} dan λ_{280} . DNA yang murni memiliki nilai perbandingan absorbansi $\lambda_{260}/\lambda_{280}$ 1.7 – 2.

Studi *in vitro* dengan *Calf thymus* DNA dan B[a]P

Sebanyak $\pm 5\mu\text{g}$ (dalam 50 μL) *calf thymus* DNA (100 $\mu\text{g/mL}$) di dalam buffer fosfat 0.1 M (pH 7.4 dan 8.5) diinkubasi dengan $\pm 50\mu\text{g}$ (dalam 50 μL) larutan benzo[a]piren (1000 $\mu\text{g/mL}$) sebagai senyawa penyumbang radikal pada variasi suhu inkubasi 37°C dan 60°C dengan waktu inkubasi selama 2 jam.

Studi *in vitro* dengan *Calf thymus* DNA dan CuCl_2

Sebanyak $\pm 5\mu\text{g}$ (dalam 50 μL) *calf thymus* DNA (100 $\mu\text{g/mL}$) di dalam buffer fosfat 0.1 M (pH 7.4 dan 8.5) diinkubasi dengan $\pm 85\mu\text{g}$

(dalam 50 μL) larutan CuCl_2 1.2×10^{-2} M (170 $\mu\text{g/mL}$) sebagai senyawa penyumbang radikal pada variasi suhu inkubasi 37°C dan 60°C dengan waktu inkubasi selama 2 jam.

Studi *in vitro* dengan penambahan TiO_2

Sebanyak $\pm 5\mu\text{g}$ (minimal 50 μL) *calf thymus* DNA (100 $\mu\text{g/mL}$) di dalam buffer fosfat 0.1 M (pH 7.4 dan 8.4) diinkubasi dengan 1 mg TiO_2 anatase pada suhu ruang dengan waktu inkubasi selama 2 jam.

Hidrolisis *Calf thymus* DNA

Campuran DNA dan senyawa penyumbang radikal setelah inkubasi, disentrifugasi untuk diambil filtratnya kemudian filtrat dihidrolisis menggunakan enzim *micrococcus nuclease* (MN) dan enzim *spleen phosphodiesterase* (SPDE) (perbandingan enzim 0.02 unit : 0.002 unit) dengan total campuran enzim sebanyak 100 μL . Campuran ditambahkan 133 μL natrium suksinat 10mM pH 6 dan kalsium klorida 5mM. Campuran diinkubasi selama 3 jam pada suhu 37°C , kemudian dianalisis dengan menggunakan HPLC.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk memberikan informasi ilmiah mengenai dampak senyawa penyumbang radikal bebas yang memicu terjadinya kerusakan oksidatif pada DNA. Terdapat beberapa bukti yang menunjukkan bahwa kerusakan oksidatif DNA bersifat promutagenik dan memiliki potensi sebagai biomarker terjadinya kanker (Kasai, 1997). Pada penelitian ini, dilakukan studi *in vitro*

menggunakan *calf thymus* DNA murni yang dikondisikan pada pH fisiologis dan direaksikan dengan senyawa yang memiliki toksisitas tinggi dan memiliki potensi dalam pembentukan radikal bebas seperti Benzo[a]Piren (B[a]P), CuCl_2 dan TiO_2 .

Hasil uji kemurnian DNA

Pengukuran absorbansi menggunakan spektroskopi UV-Visible merupakan pengukuran yang dilakukan untuk melihat absorpsi suatu molekul pada panjang gelombang yang spesifik. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini merupakan sampel DNA murni dari *calf thymus*. Dalam prosedur penelitian di bidang biologi molekuler, kuantifikasi konsentrasi maupun uji kemurnian asam nukleat perlu dilakukan untuk meyakinkan bahwa hasil penelitian yang didapat akurat. Kuantifikasi ini dilakukan diantaranya dengan menggunakan pendekatan pengukuran absorbansi dengan spektrofotometri, dimana jumlah sinar yang terserap oleh sampel akan sebanding dengan konsentrasi protein maupun asam nukleat yang terkandung dalam sampel DNA (Teare, 1997). DNA murni diukur dengan perbandingan absorbansi DNA pada panjang gelombang maksimal di 260 nm dan 280 nm menggunakan spektroskopi UV-Visible. DNA yang murni memiliki nilai perbandingan absorbansi $\lambda_{260}/\lambda_{280}$ 1.7 – 2.

$$\lambda_{260} = 0.042$$

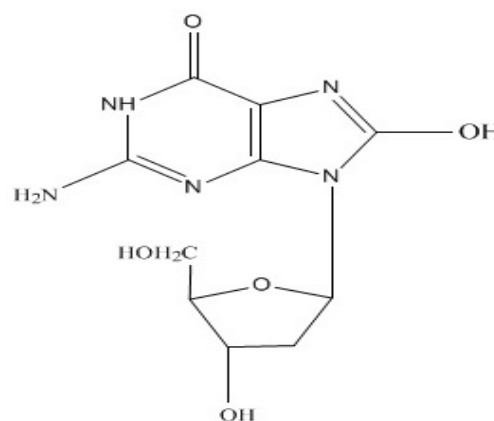
$$\lambda_{280} = 0.022$$

$$\lambda_{260}/\lambda_{280} \sim 1.9$$

Rasio absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm digunakan sebagai penilaian kemurnian DNA dan RNA. Baik DNA maupun RNA memiliki serapan maksimal di panjang gelombang 260 nm, dimana kebanyakan protein memiliki serapan tinggi di panjang gelombang 280 nm. Asam nukleat secara signifikan dapat terabsorpsi pada panjang gelombang 280 nm (50%-55% dari absorbansi di panjang gelombang 260 nm), dan beberapa protein dapat terabsorpsi kuat juga pada panjang gelombang 260 nm (nilai absorbansi tergantung dari jenis protein). Sehingga akan sulit untuk mengukur konsentrasi DNA, RNA dan protein secara akurat dalam campuran senyawa kompleks. Namun, pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm dapat menggambarkan kemurnian sampel asam nukleat secara valid. Rasio $\lambda_{260}/\lambda_{280}$ sekitar ~ 1.8 secara umum diterima sebagai nilai DNA murni, sedangkan rasio ~ 2.0 secara umum diterima sebagai nilai RNA murni; nilai rasio di bawah nilai tersebut mengindikasikan keberadaan protein, fenol atau pengotor lain yang memiliki serapan tinggi di panjang gelombang sekitar 280 nm (Gallagher, S.R., 1989).

Hidrolisis *calf thymus* DNA dengan enzim MN dan SPDE dilakukan berdasarkan Gupta 1992. Perbandingan rasio DNA:enzim teregulasi berdasarkan waktu inkubasi, rasio yang digunakan untuk hasil hidrolisis DNA adalah 1:3 (enzim:DNA) untuk waktu inkubasi selama ± 3 jam, dan 1:10 (enzim:DNA) untuk waktu inkubasi ± 24 jam.

Perbandingan enzim yang MN : SPDE yang digunakan pada percobaan ini adalah 10 : 1 (20 Units/mL MN : 2 Units/mL SPDE) dalam 100 μ L larutan untuk DNA 100 μ g/mL. Selain itu, digunakan larutan hidrolisis enzim CaCl_2 dan natrium suksinat dengan perbandingan konsentrasi natrium suksinat : CaCl_2 adalah 2:1. Larutan ini digunakan untuk mengaktifkan kerja enzim MN : SPDE untuk menghidrolisis DNA. Perbandingan volume enzim : larutan hidrolisis adalah 3 : 4. Hidrolisis DNA dengan enzim dilakukan pada suhu 37°C selama 2 jam. Adapun hasil peak hidrolisis DNA 100 μ g/mL dengan enzim MN : SPDE dapat dilihat pada Gambar 2. Dilakukan pula spike standar 8-OHdG 100 ppb pada DNA yang telah dihidrolisis. Kromatogram standar 8-OHdG konsentrasi 100 ppb hasil spike muncul adalah pada waktu retensi sekitar 3.8 menit. Senyawa 8-OHdG yang dianalisis dalam percobaan ini terdeteksi pada sampel dan dihitung sebagai konsentrasi 8-OHdG dalam ppb. Terdeteksinya 8-OHdG pada sampel menandakan bahwa senyawa yang memiliki toksisitas tinggi seperti B[a]P, dan penyumbang radikal bebas CuCl_2 dan



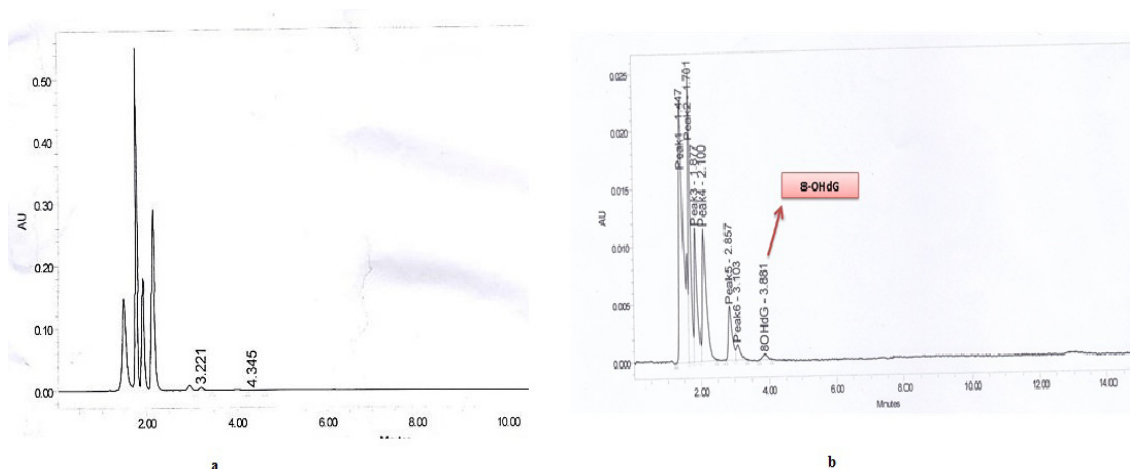
Gambar 1. Struktur 8-hidroksi deoksiguanosin (8-OHdG)

TiO₂, berkontribusi dalam pembentukan spesies oksigen reaktif (•OH). Radikal hidroksil (•OH) yang terbentuk dapat menyerang posisi C-8 basa guanin pada DNA sehingga membentuk DNA *adduct*, 8-OHdG (Gambar 1).

Inkubasi *Calf thymus* DNA dengan senyawa pemicu radikal bebas (B[a]P dan CuCl₂)

Inkubasi *calf thymus* DNA dengan senyawa pemicu radikal bebas seperti B[a]P dan CuCl₂ dilakukan dengan berbagai variasi kondisi, diantaranya adalah variasi pH pelarut *calf thymus* DNA berdasarkan pH fisiologis manusia (7.35-7.45) dipilih pH 7.4 serta dipilih pH 8.5 sebagai perbandingan kondisi pH yang lebih tinggi untuk melihat profil pembentukan *adduct* 8-OHdG.

Variasi kondisi yang lain adalah variasi suhu. Variasi suhu ini hanya digunakan untuk inkubasi *calf thymus* DNA dengan senyawa B[a]P dan CuCl₂. Suhu yang digunakan adalah suhu 37°C yang masih merupakan temperatur fisiologis manusia sehingga diharapkan dapat menggambarkan kondisi tubuh, dimana dapat terjadi berbagai reaksi metabolisme. Selain itu dipilih suhu yang lebih tinggi, yaitu 60°C untuk melihat pengaruh peningkatan suhu karena berdasarkan teori, kenaikan suhu dapat menyebabkan reaksi kimia terjadi lebih cepat. Perbedaan suhu yang ekstrim ini diharapkan dapat menunjukkan perbedaan pengaruh pembentukan *adduct* 8-OHdG yang lebih signifikan.



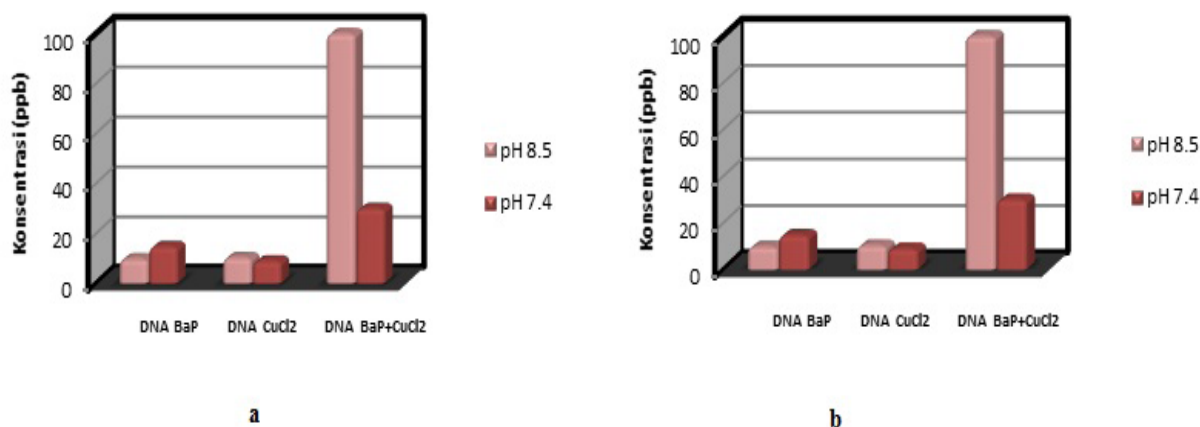
Gambar 2. Kromatogram *calf thymus* DNA hasil hidrolisis (a) dan spike 100 ppb 8-OHdG (b)

Pengaruh senyawa pemicu radikal bebas (B[a]P dan CuCl₂) pada pembentukan DNA Adduct (8-OHdG). Hasil inkubasi *calf thymus* DNA dalam buffer fosfat pH 7.4 dan 8.5 dengan senyawa B[a]P dan CuCl₂ pada suhu 37°C dan 60°C dapat dilihat pada gambar 3.

Dilakukan inkubasi *calf thymus* DNA dengan masing-masing senyawa, B[a]P maupun CuCl₂, kemudian dilanjutkan dengan inkubasi *calf thymus* DNA dengan kombinasi kedua senyawa B[a]P dan CuCl₂. Gambar pembentukan DNA *adduct* (8-OHdG) dari hasil inkubasi menunjukkan

bahwa terjadi pembentukan 8-OHdG karena adanya paparan senyawa B[a]P maupun CuCl_2 . Kedua senyawa juga mampu bersinergis untuk memicu pembentukan DNA *adduct* 8-OHdG. Inkubasi *calf thymus* DNA di suhu 37°C pada kondisi pH 7.4 dengan B[a]P dan CuCl_2 dapat dilihat pada Gambar 3. Gambar menunjukkan bahwa inkubasi dengan senyawa B[a]P maupun CuCl_2 mampu memberikan kontribusi pembentukan 8-OHdG. Konsentrasi 8-OHdG yang dihasilkan adalah 14.67 ppb untuk inkubasi dengan B[a]P dan 8.86 ppb untuk inkubasi dengan CuCl_2 . Campuran kedua senyawa (B[a]P dan CuCl_2), keduanya dapat saling sinergis membentuk DNA *adduct* 8-OHdG, sebanyak 29.9 ppb.

Inkubasi *calf thymus* DNA dengan B[a]P dan CuCl_2 pada suhu 37°C dan pH 8.5 ditunjukkan pada gambar 6. Hasil menunjukkan bahwa inkubasi *calf thymus* DNA dengan B[a]P dan CuCl_2 pada pH 8.5 memberikan kontribusi dalam pembentukan 8-OHdG. Hasil *adduct* yang didapat tidak jauh berbeda dengan *adduct* dari pH 7.4, dimana untuk inkubasi dengan B[a]P dihasilkan 8-OHdG sebanyak 9.7 ppb dan CuCl_2 sebanyak 10.2 ppb. Sedangkan untuk pembentukan *adduct* dari hasil inkubasi kedua senyawa, memberikan peningkatan konsentrasi yang cukup signifikan dibandingkan dengan pH 7.4.



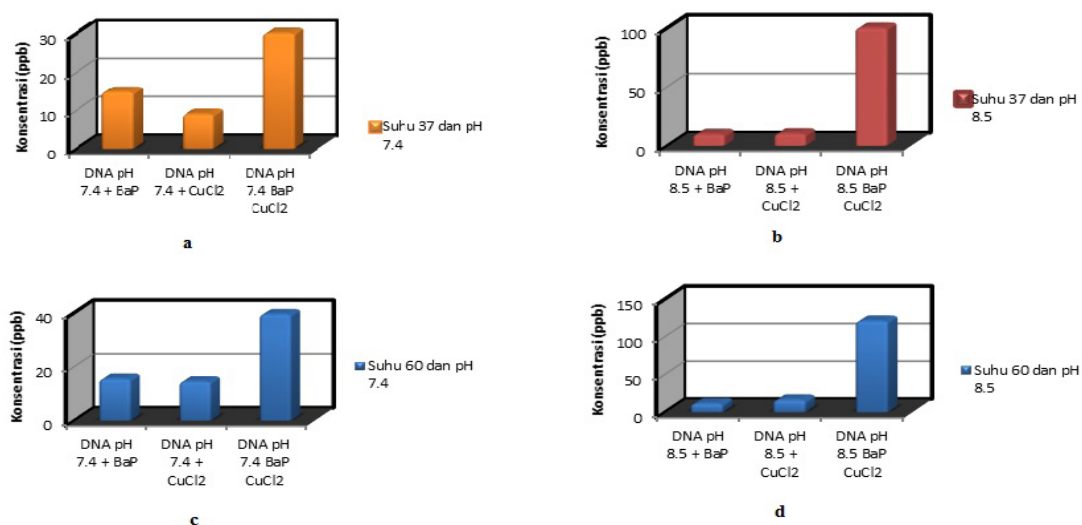
Gambar 3. Pengaruh senyawa pemicu radikal bebas (B[a]P dan CuCl_2) pada pembentukan DNA *Adduct* (8-OHdG). a) suhu 37°C b) suhu 60°C

Inkubasi *calf thymus* DNA dengan senyawa B[a]P dan CuCl_2 pada pH 7.4 dan 8.5 juga dilakukan di suhu 60°C . Profil pembentukan DNA *adduct* 8-OHdG memberikan trend yang sama dengan profil di suhu 37°C . Inkubasi *calf thymus* DNA dengan B[a]P dan CuCl_2 pada suhu 60°C baik di pH 7.4

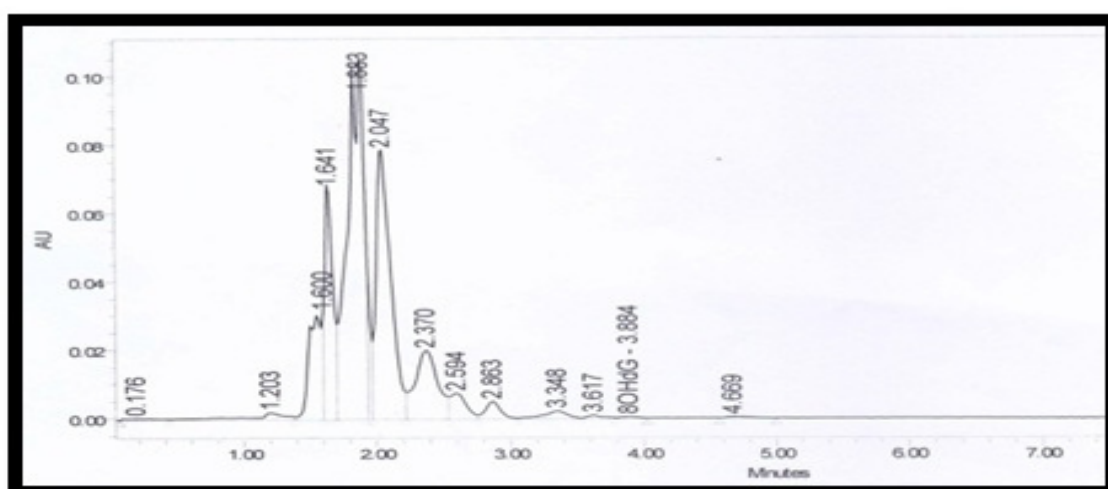
maupun 8.5 menghasilkan pembentukan *adduct* 8-OHdG yang lebih tinggi dibandingkan inkubasi *calf thymus* DNA di suhu 37°C . Pada suhu 60°C , hasil *adduct* 8-OHdG dari inkubasi *calf thymus* DNA dengan B[a]P dan CuCl_2 lebih banyak dikarenakan semakin tingginya suhu,

maka akan semakin mempercepat reaksi. Pada suhu 60°C, kedua pH, baik 7.4 dan 8.5 yang diinkubasi dengan dua senyawa B[a]P dan CuCl₂ bersinergis dalam pembentukan DNA Adduct (8-OHdG). Profil kromatogram HPLC hasil inkubasi *calf thymus* DNA pH 8.5 dan suhu 60°C dengan B[a]P menunjukkan hasil pembentukan 8-OHdG sebanyak 11.366 ppb (Gambar 5).

Beberapa tipe reaksi kimia yang telah diketahui dapat mengalami pembentukan H₂O₂, O₂^{•-}, atau HO[•]. Berdasarkan beberapa penelitian sebelumnya (Bryla, 1991), hipotesis dari reaksi yang terjadi adalah terjadinya oksidasi B[a]P selama inkubasi dengan *calf thymus* DNA yang menyebabkan terbentuknya H₂O₂, O₂^{•-}, dan

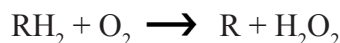


Gambar 4. Pengaruh senyawa pemicu radikal bebas (B[a]P dan CuCl₂) pada pembentukan DNA Adduct (8-OHdG) a) suhu 37°C dan pH 7.4, b) suhu 37°C dan pH 8.5, c) suhu 60°C dan pH 7.4, d) suhu 60°C dan pH 8.5



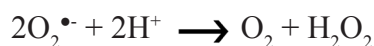
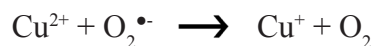
Gambar 5. Profil kromatogram HPLC inkubasi benzo[a]piren dan *Calf thymus* DNA pH 8.5 suhu 60°C

HO• yang dapat menyebabkan terjadinya binding B[a]P dengan DNA.

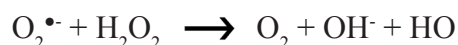


Pada reaksi antara B[a]P dan CuCl_2 , terdapat peran Cu^{2+} sebagai mediator ion yang mengalami siklus redoks Cu(II)/Cu(I). Reaksi ini melibatkan transfer elektron yang dapat menyebabkan B[a]P juga dapat teroksidasi. Prinsip reaksi Haber-Weiss dengan menggunakan katalis Fe, menggambarkan reaksi pembentukan hidroksi radikal.

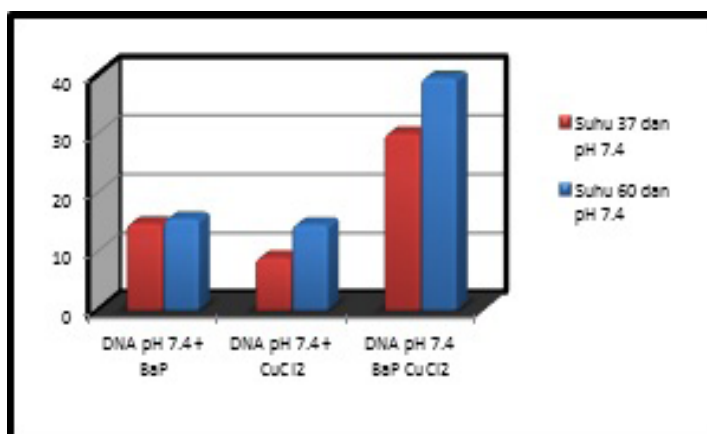
Ion Cu berpotensi pula menghasilkan hidroksi radikal berdasarkan reaksi Haber-Weiss (Minotti, 1987). Selain itu, reaksi Fenton juga menggambarkan terbentuknya $\text{O}_2^{\bullet-}$ dan H_2O_2 dengan keberadaan ion Cu^{2+} (Bodell, 1989).



Ketika tidak melibatkan Cu, reaksi yang mungkin terjadi dalam pembentukan hidroksi radikal adalah, sebagai berikut :



Pengaruh suhu pada pembentukan DNA Adduct (8-OHdG). Berdasarkan teori, peningkatan suhu akan mempercepat reaksi kimia. Hal ini dibuktikan dengan membandingkan suhu inkubasi *calf thymus* DNA dengan senyawa B[a]P dan CuCl_2 . Suhu yang digunakan adalah 37°C dan 60°C. Gambar 6 menunjukkan pengaruh suhu terhadap pembentukan DNA adduct 8-OHdG hasil dari inkubasi *calf thymus* DNA dengan B[a]P dan CuCl_2 pada kondisi pH 7.4.

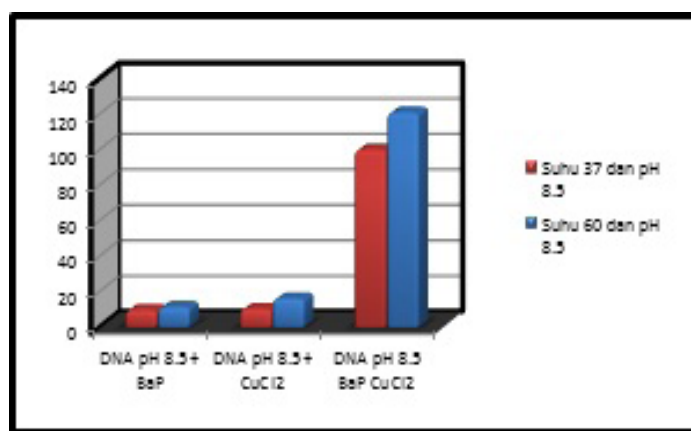


Gambar 6. Pengaruh suhu terhadap pembentukan DNA Adduct 8-OHdG pada pH 7.4

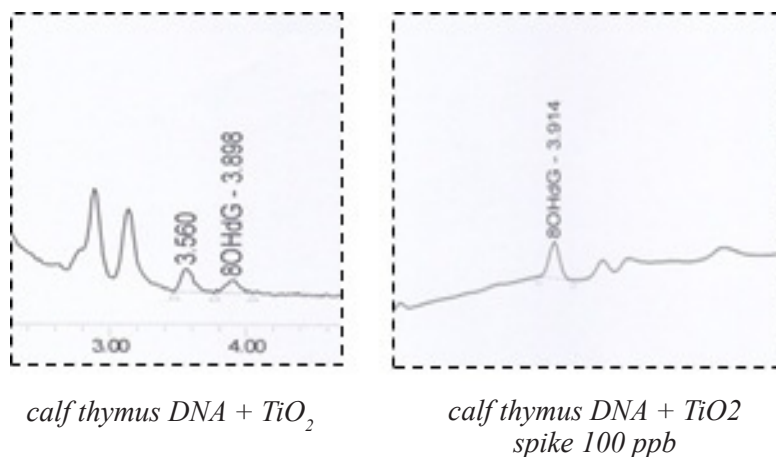
Profil dari gambar 6 juga menunjukkan bahwa pada suhu inkubasi 60°C, DNA *adduct* 8-OHdG yang terbentuk mengalami peningkatan. Begitu pula trend pembentukan DNA *adduct* 8-OHdG yang terjadi dengan kondisi pH 8.5. yang ditunjukkan pada gambar 7.

Pembentukan 8-OHdG dari senyawa pemicu radikal bebas (TiO₂ dan B[a]P).

Hasil pengukuran konsentrasi *adduct* 8-OHdG dari hasil inkubasi *calf thymus* DNA dengan TiO₂ pada pH 7.4 menggunakan HPLC menunjukkan luas area peak kromatogram 8-OHdG sebesar 3791 pada waktu retensi 3.89



Gambar 7. Pengaruh suhu terhadap pembentukan DNA *Adduct* 8-OHdG pada pH 7.4



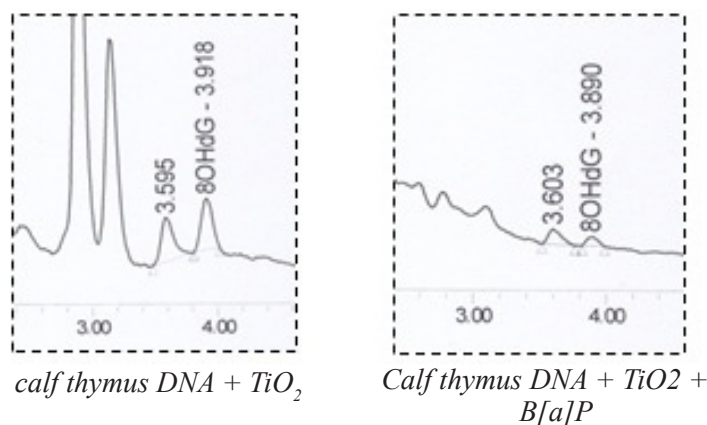
Gambar 8. Kromatogram hasil inkubasi *calf thymus* DNA dan TiO₂ pH 7.4

menit. Kemudian dilakukan spike standar 8-OHdG 100 ppb untuk meyakinkan bahwa peak yang didapat merupakan senyawa 8-OHdG terjadi penambahan luas area di waktu retensi 3.9 sebesar 53674.

Hasil perhitungan konsentrasi *adduct* yang didapat dari hasil inkubasi *calf thymus* DNA dengan TiO_2 pada kondisi pH 7.4. Hasil menunjukkan bahwa inkubasi *calf thymus* DNA dengan TiO_2 di pH 7.4 menghasilkan *adduct* yang cukup banyak. Senyawa TiO_2 berperan sebagai penghasil radikal bebas. Sebagai semikonduktor, TiO_2 memiliki aktivitas fotokatalisis yang baik. Ketika partikel TiO_2 mengabsorpsi cahaya dengan energi yang lebih tinggi dari *band gap*-nya (3.2 eV), elektron pada pita valensi akan tereksitasi ke pita konduksi, menghasilkan pasangan hole elektron. *Electron hole* tersebut jika bereaksi dengan air dapat membentuk spesi oksigen reaktif, seperti HO^\bullet , HO_2^\bullet , H_2O_2 . Reaksi ini disebut sebagai reaksi fotokatalisis. OH radikal yang terbentuk, dapat menyerang C-8 Guanin yang menyebabkan terbentuknya

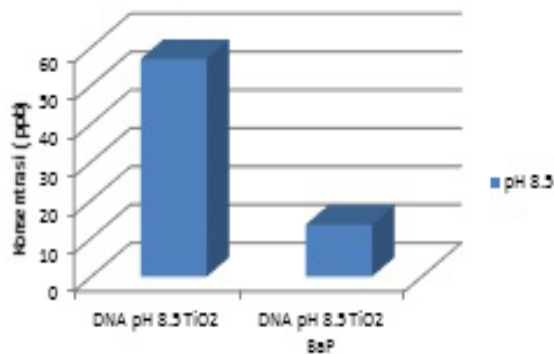
adduct 8-OHdG. Penambahan B[a]P pada kondisi inkubasi yang sama memberikan pengaruh peningkatan konsentrasi *adduct* 8-OHdG yang dihasilkan. Dalam penelitian Liu 1998, senyawa karsinogen seperti B[a]P dapat menginduksi pembentukan 8-OHdG pada beberapa jaringan target. Pada saat inkubasi dengan *calf thymus* DNA, senyawa B[a]P yang diberi paparan sinar UV A (280 nm – 320 nm) dapat berperan sebagai photosensitizer yang merupakan proses penyerapan cahaya oleh suatu molekul, yang melibatkan transfer energi secara langsung sehingga menghasilkan spesi oksigen reaktif yang dapat berinteraksi dengan DNA.

Pada inkubasi *calf thymus* DNA dengan TiO_2 di pH 8.5, *adduct* yang dihasilkan cukup banyak, dimana kromatogram dari uji dengan HPLC menunjukkan luas area 8-OHdG sekitar 17100 dengan estimasi konsentrasi yang didapat sebesar 57 ppb (Gambar 9). Sedangkan hasil dari inkubasi *calf thymus* DNA dan TiO_2 dengan penambahan B[a]P pada kondisi yang sama, *adduct* yang didapat tidak sebanyak inkubasi *calf thymus* DNA dengan senyawa TiO_2 .



Gambar 9. Kromatogram hasil inkubasi *Calf thymus* DNA dengan TiO_2 dan B[a]P

Perbandingan hasil *adduct* DNA dengan TiO_2 dan B[a]P dapat dilihat pada gambar 10.



Gambar 10. Studi pembentukan *Adduct* 8-OHdG dengan TiO_2 dan B[a]P pada pH 8.5

KESIMPULAN

1. Rasio kemurnian DNA $\lambda 260/\lambda 280$ adalah ~ 1.9 ,
2. Terjadi pergeseran puncak gelombang maksimum DNA pada inkubasi *calf thymus* DNA dan senyawa B[a]P, dari 252 nm menjadi 307 nm – 318 nm untuk inkubasi 1 jam serta 312 nm – 318 nm untuk inkubasi 3 jam.
3. Terjadi pergeseran puncak gelombang maksimum DNA pada inkubasi *calf thymus* DNA dan CuCl_2 , dari 252 nm menjadi 264 nm – 274 nm untuk inkubasi 1 jam serta 281 nm – 287 nm untuk inkubasi 3 jam.
4. Ketiga senyawa penyumbang radikal yang digunakan dalam penelitian ini (B[a]P, CuCl_2 , dan TiO_2) memiliki kontribusi dalam pembentukan DNA *Adduct* (8-OHdG),

5. Pembentukan 8-OHdG oleh Benzo[a]Piren semakin meningkat dengan adanya CuCl_2 pada inkubasi di bawah kondisi pH 7.4 dan 8.5,
6. Pembentukan 8-OHdG semakin banyak terbentuk setelah inkubasi di suhu 60°C
7. Pada suhu ruang ($27^\circ\text{--}30^\circ\text{C}$), inkubasi *calf thymus* DNA dengan TiO_2 pada pH 8.5 dengan bantuan sinar uv mampu menghasilkan DNA *Adduct* (8-OHdG) paling tinggi sebesar $57.025 \mu\text{g/L}$.

DAFTAR ACUAN

- Askoxylakis, V., Thieke, C., Pleger, Sven T., *et.al.* (2010). Long-term survival of cancer patients compared to heart failure and stroke: A systematic review. *BMC Cancer*, 10, 105
- Beach, A.C., Gupta, R.C. (1992). Human Biomonitoring and the ^{32}P -Postlabeling assay. *Carcinogenesis*, 13(7), 1053-1074
- Bryla, P., and Weyand, E.H. (1991). Role of activated oxygen species in Benzo[a]Pyrene : DNA –*Adduct* Formation in vitro. *Free Radical Biology & Medicine*, 11, 17-24
- Budiawan and Eder, Erwin. (2000). Detection of 1, N2-Propanodeoxyguanosine *Adduct* in DNA of Fischer 344 Rats by An Adapted ^{32}P -Post-Labeling Technique After Per Os Application of Crotonaldehyde. *Carcinogenesis*, 21(6), 1191-1196

- Eder, E. and Budiawan. (2001). Cancer risk assessment for the environmental mutagen and carcinogen crotonaldehyde on the basis of TD50 and comparison with 1,N2-propanodeoxyguanosine adduct levels, *Cancer Epidem. Biom. Prev.* 10, 883-888
- Guindon, K. (2008). *Investigation of the role of oxidative DNA damage in aflatoxin B1-Induced pulmonary Carcinogenesis.* Departemen Farmakologi dan Toksikologi: Universitas Queen
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70
- Huang, Ning-ping., Xu, Min-hua., Yuan, Chun-wei., Yu, Rui-rong. (1997). The study of the photokilling effect and mechanism of ultrafine TiO₂ particles on U937 cells. *China Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 108, 229-233
- Gupta. R. C. (1985). Enhanced sensitivity of 12P-postlabeling analysis of aromatic carcinogen: DNA adducts. *Cancer Research*, 45, 5656-5662
- Halliwell, B., M. Whiteman. 2004. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture :how should you do it and what do the results mean?. *British Journal of Pharmacology*, 142, 231-255
- Hofer, T. 2001. Method Development for Analysis of 8-oxodG as a Biomarker for Oxidative Stress. Departemen Biosains: Institut Karolinska
- Hiraku, Y. dan Kawanishi, S. (1996). Oxidative DNA damage and apoptosis induced by benzene metabolites. *Cancer Research*, 56, 5172-5178
- IARC. (1989). Occupational exposures in petroleum refining; Crude oil and major petroleum fuels. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, vol. 45. Lyon, France:International Agency for Research on Cancer. 322 pp
- IARC. (1989). Titanium Dioxide. IARC Summary & Evaluation, Volume 47
- IPCS WHO (International Programme on Chemical Safety – World Health Organization). (1998). EHC 202 : Selected Non- Heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, World Health Organization, Geneva
- Inoue, O., et al. (2000). Urinary Phenylmercapturic Acid as a Marker of Occupational Exposure to Benzene. *Industrial Health*, 38, 195-204
- Kasai, H., Kawai, K. dan Li, Y. (2008). Analysis of 8-OH-dG and 8-OH-Gua as biomarkers of oxidative stress. *Genes and Environment*, 30, 33-40
- Kasai H. (1997). Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutation Research*, 387, 147-163
- Khan, S.A., Carmichael, P.L., Robinson, S.D.Taylor., Habib, N., Thomas H.C. (2003). DNA Adducts, detected by ³²P postlabelling, in human cholangiocarcinoma. *Gut* 2003, 52, 586-591

- Kim EJ, Choi SD, Chang YS. (2011). Levels and patterns of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soils after forest fires in South Korea. *Environmental Science and Pollution Research International*, 18(9), 1508-17
- Kim, S., dkk. 2006. Using urinary biomarkers to elucidate dose-related patterns of human benzene metabolism. *Carcinogenesis*, 27(4), 772-781
- Kim, Sun Young., Taguchi, Takao., Nishioka, Motomu., Taya, Masahito. (2004). Quantitative Assessment of DNA Damage Accompanied with No Substantial Loss in Its Molecular Weight During Exposure to Oxidative Stress. *Biochemical Engineering Journal*, 22, 81-87
- Klauning, J.E., Z. Ang *et al.* (2011). Oxidative Stress and Oxidative Damage in Chemical Carcinogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 24, 86-99
- Liu, Z., Lu, Y., R, Barry., L, Mark., Wei, Huachen. (1998). Benzo[a]Pyrene Enhances the Formation of 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine by Ultraviolet A Radiation in *Calf thymus* DNA and Human Epidermoid Carcinoma Cells. *Biochemistry*, 37, 10307-10312
- Lodovici, Maura and Bigagli, Elisabetta. (2009). Biomarkers of induced active and passive smoking damage. *International Journal of Environmental Research Public Health*, 6, 874-888
- Lorentzen, Ronald J., Caspary, William J., Lesko, Stephen A. (1975). Autooxidation of 6-hydroxybenzo[a]pyrene and 6-oxobenzo[a]pyrene radical, reactive metabolites of benzo[a]pyrene. *Biochemistry*, 14(18), 3970-3977
- Minotti, G., Aust, S.D. (1989). The role of iron in oxygen radical mediated lipid peroxidation. *Chemistry Biology*, 244, 6049-6055
- Mizoue, T., Kasai, H., Kubo, T., dan Tokunaga, S. (2006). Leanness, Smoking, and Enhanced Oxidative DNA Damage. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 582-585
- Phillips, D.H. and Castegnaro, M. (1999). Standardization and Validation of DNA Adduct Postlabelling Methods : Report of Interlaboratory Trials and Production of Recommended Protocols. *Mutagenesis*, 14(3), 301-315
- Ramkumae, Kunga Mohan., Manjula, Chinnasamy., Kumar, Georgepeter Gnana., Kanjwal, Muzafar A. (2012). Oxidative stress-mediated cytotoxicity and apoptosis induction by TiO₂ nanofibers in HeLa cells. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 81, 324-333
- Teare, J.M., R., Islam., Flanagan, R., Gallagher, S., Davies, M.G., and Grabau, C. (1997). Measurement of nucleic acid concentrations using the DyNa Quant TM and the Gene Quant TM. *Biotechniques*, 22, 1170-1174
- Tharnpoophasiam, P., Kongtip, P., Wongwit, W., Fungladda, W., dan Kitayaporn, D. (2004). Simultaneous determination of trans, trans-muconic acid and S-Phenylmercapturic acid by high

- pressure liquid chromatography and its Application. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 35(3)
- Valavanidis, A., Vlachogianni, T., dan Fiotakis, C. (2009). 8-hydroxy-2_-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *Journal of Environmental Science and Health Part C*, 27, 120–139
- Valko, Marian., Leibfritz, Dieter., Moncol, Jan., Cronin, Mark.T.D., Mazur, Milan., Telser, Joshua. (2007). Free radicals and antioi-dants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 44-84
- Vergnoux A, Malleret L, Asia L, Doumenq P, Theraulaz F. (2011). Impact of forest fires on PAH level and distribution in soils. *Environmental Research*, 111(2), 193-8
- Weisburger J.H., and G.M.Williams. (1984). *Bioassay of carcinogens : in vitro and in vivo test, in : Chemical Carcinogens* (2nd edition) Vol.2, C.E Searle (ed), ACS Monograph 182, 1323-1373. Washington D.C: American Chemical Society
- World Health Organization. (2014). *News Realeses : Seven million premature deaths annually linked to air pollution*. Geneva: WHO
- Zhang, L., Huang, M., Blair, I.A., Penning, T.M. (2013). Interception of Benzo (a) pyrene-7,8-dione by UDP Glucuronosyltransferase (UGTs) in Human Lung Cells. *Chemical Research in Toxicology*, 26 (10), 1570–1578
- Zhang, Zhihua and Miriam C. Poirier. (1997). Cisplatin-DNA Adduct Determination in the Hepatic Albumin Gene as Compared to Whole Genomic DNA. 10, 971-977
- Zhang, Y.J., Geacintov, N.E., and Santella, R.M. (1997). Development of Monoclonal Antibody Recognizing Beno[c] phenanthrenediol Epoxide-DNA Adducts: Application to Immunohistochemical Detection of DNA Damage. *Chemical Research in Toxicology*, 10, 948-952